

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

METODY STUDIA FOSFOPROTEINŮ ROSTLIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MARTINA VÁLKOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# METODY STUDIA FOSFOPROTEINŮ ROSTLIN

METHODS FOR STUDY OF PLANT PHOSPHOPROTEINS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

MARTINA VÁLKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Mgr. RADKA DOPITOVÁ, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0102/2006</b>	Akademický rok: <b>2009/2010</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Martina Válková</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	<b>Mgr. Radka Fohlerová</b>	
Konzultanti:	Mgr. Dana Vránová, Ph.D.	

### Název bakalářské práce:

Metody studia fosfoproteinů rostlin

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Výběr a realizace vhodné metody pro stanovení fosfoproteinů rostlin
3. Přehledné zpracování získaných výsledků a jejich souhrnné hodnocení

### Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Martina Válková  
Student(ka)

-----  
Mgr. Radka Fohlerová  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2006

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Reverzibilně fosforylované proteiny se uplatňují u řady základních buněčných procesů. Příkladem je přenos cytokininového signálu u rostlin, který je zprostředkovaný tzv. dvou-komponentním systémem zahrnujícím fosforylaci histidinu a aspartátu. Vzhledem k velmi nízké stabilitě fosforylace těchto aminokyselin je obtížné najít vhodnou metodu pro její studium.

Předložená bakalářská práce se ve své teoretické části zabývá jak současnými experimentálními přístupy pro analýzu fosforylace proteinů dvou-komponentních systémů, tak hledáním nových způsobů pro tuto analýzu. Jsou zde popsány metody založené na značení proteinů pomocí  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  a na detekci uvolněného fosfátu pomocí kolorimetrických metod nebo pomocí ICP-MS. Další možností je citlivá identifikace fosforylovaných a ne-fosforylovaných forem proteinu fúzaného s GFP pomocí techniky CE-LIF.

Praktická část práce se věnuje optimalizaci vybraných kolorimetrických metod a přípravě proteinu AHP5 fúzaného s GFP pro analýzu CE-LIF.

## ABSTRACT

Reversibly phosphorylated proteins play a role in many fundamental cellular processes. An example is the cytokinin signal transduction pathway in plants that is mediated by the so-called two-component system involving histidine and aspartate phosphorylation. Due to the very low stability of phosphorylation of these amino acids, is difficult to find a suitable method for phosphorylation studies.

The theoretical part of this bachelor thesis describes not only the current experimental approaches for analysis of protein phosphorylation in two-component systems but also is trying to propose new approaches for this analysis. There are described methods based on labeling of proteins using  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  and on the detection of released phosphate employing the colorimetric method or ICP-MS. Another possibility is sensitive identification of phosphorylated and non-phosphorylated forms of protein fused with GFP using CE-LIF technique.

The practical part of the thesis deals with optimization of the selected colorimetric methods and also is focused on the preparation of the AHP5 protein fused with GFP for CE-LIF analysis.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Dvoukomponentní systémy, cytokininová signální dráha, fosforylace proteinů, fosfohistidin, fosfoaspartát, radioaktivní značení proteinů, kolorimetrické stanovení fosfátu, hmotnostní spektrometrie, ICP-MS, CE-LIF

## KEYWORDS

Two-component system, cytokinin signalling pathway, protein phosphorylation, phosphohistidine, phosphoaspartate, radioactive protein labelling, colorimetric phosphate detection, Mass spectrometry, ICP-MS, CE-LIF

VÁLKOVÁ, M. Metody studia fosfoproteinů rostlin. Brno, 2010. 33 s. Bakalářská práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Radka Dopitová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě chci zejména poděkovat své školitelce Mgr. Radce Dopitové, Ph.D. nejen za odborné vedení, ale i velkou podporu a pomoc. Dále děkuji RNDr. Janu Hejátkovi, Ph.D. za možnost vypracování praktické části mé bakalářské práce v naší laboratoři, celému kolektivu LMFR a také své konzultantce Mgr. Daně Vránové, Ph.D z Fch VUT. Na závěr mé poděkování patří mé rodině za obrovskou podporu při celém studiu.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	7
2.1 Posttranslační modifikace .....	7
2.1.1. Fosforylace .....	7
2.2. Dvoukomponentní systémy (two-component system, TCS) .....	8
2.2.1. Tok fosfátu v TCS .....	10
2.2.2. Dvoukomponentní systémy a cytokininová signalizace u <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	10
2.2.2.1. Cytokiny .....	10
2.2.2.2. Cytokininová signalizace u <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
2.2.3. Stabilita fosfohistidinu .....	12
2.3. Současné metody studia fosforylace a přenosu fosfátu .....	12
2.3.1. Metody hmotnostní spektrometrie .....	13
2.3.1.1. Identifikace bílkovin metodou peptidového mapování .....	13
2.3.2. Metody pro studium histidinové fosforylace.....	14
2.3.2.1. Metody radioaktivního značení.....	15
2.3.2.2. Metody kolorimetrické .....	16
2.3.2.3. ICP-MS .....	16
2.3.2.4. CE-LIF .....	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	19
3.1. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE).....	19
3.2. Barvení molybdenanem amonným a malachitovou zelení .....	20
3.2.1 Určení citlivosti metody .....	21
3.2.2. Barvení vzorků proteinů .....	21
3.2.3. Vymytí SDS z gelu .....	21
3.3. Příprava lyzátu pro CE-LIF .....	21
3.4. Westernový přenos.....	22
4. VÝSLEDKY .....	24
4.1. Barvení molybdenanem amonným a malachitovou zelení .....	24
4.1.1. Kalibrační řada.....	24
4.2. Barvení vzorků proteinů .....	24
4.2.1. Vymývání SDS z gelu .....	25
4.3. Příprava vzorku pro CE-LIF analýzu .....	26
5. ZÁVĚR .....	28
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	29
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	32

## 1. ÚVOD

Charakterizace fosfoproteinů a určení místa fosforylace je stále nelehkým, avšak důležitým krokem při studiu kontroly mnoha biologických funkcí a aktivit. Získání nových informací nám pomáhá pochopit biologické procesy, které probíhají v daném organismu a může se stát i základem pro aplikovaný výzkum při regulaci růstu a vývoje rostlin.

Fosforylace hraje velkou roli v mnoha signálních procesech v buňce. Příkladem mohou být proteiny dvoukomponentních systémů, které se vyskytují především u bakterií. Setkáváme se s nimi i u rostlin, kde jsou zapojeny do různých signálních drah.

V naší laboratoři se zabýváme studiem rostlinných hormonů, zejména cytokininů a zajímá nás především mechanismus přenosu cytokininového signálu v rostlinné buňce. Tato práce je zaměřena na možnosti studia fosforylace proteinů, které se účastní přenosu cytokininového signálu u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Posttranslační modifikace

Velká část proteinů nacházejících se v buňkách vyšších eukaryot je posttranslačně modifikována. Tyto modifikace jsou nezbytné pro jejich funkci a může k nim dojít hned po translaci informace z mRNA na protein nebo během další existence proteinu. Jedná se například o fosforylaci/defosforylaci, glykosylaci, methylaci, acetylaci, hydroxylaci, nitrosylaci, sumoylaci, ubikvitinaci, proteolýzu a další [35].

Kovalentní modifikace struktury proteinů většinou mění jejich molekulární hmotnost a dávají jim nové vlastnosti, ovlivňují jejich biologickou aktivitu, molekulární interakce, funkci, stabilitu.

#### 2.1.1. Fosforylace

Jednou z nejdůležitějších a také nejčastěji se vyskytujících posttranslačních modifikací proteinů je fosforylace, která byla poprvé popsána počátkem minulého století. V současné době je známo deset aminokyselin, které mohou být fosforylovány. Jsou to serin, threonin, tyrosin, histidin, lysin, arginin, aspartát, glutamát, cystein a prolin [1].

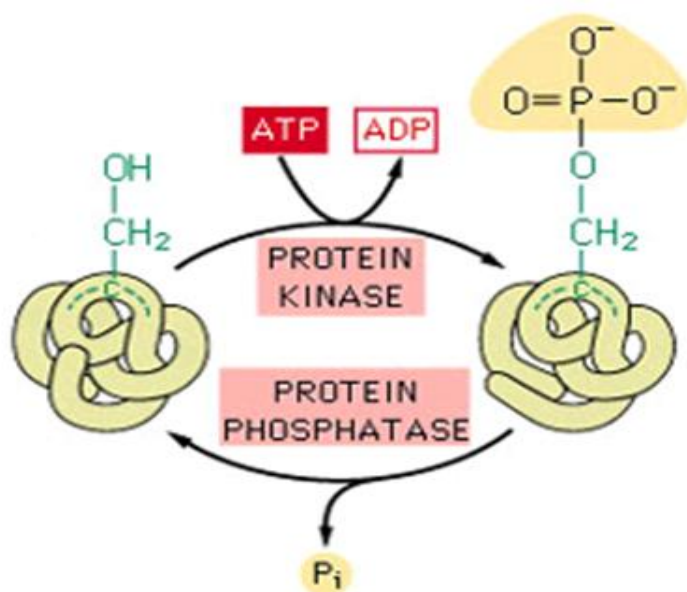
Fosforylaci proteinů v buňkách katalyzují enzymy nazývané proteinkinasy. Tyto enzymy přenášejí fosfátovou skupinu z donoru, kterým je nukleosidtrifosfát (většinou ATP), na aminokyselinový zbytek substrátového proteinu (obr. 1). Podle substrátové specifity se proteinkinasy dělí na serin/threoninkinasy (Ser/Thr), tyrosinkinasy (Tyr) a histidinkinasy (His) [2]. Defosforylaci proteinů, při které se fosfátová skupina opět uvolní, katalyzují enzymy nazývané proteinfosfatasy (obr. 1) [3]. Podobně jako proteinkinasy se podle substrátové specifity dělí na serin/threoninfosfatasy, tyrosinfosfatasy, tyrosin/serin/threoninfosfatasy a histidinfosfatasy [36].

Předpokládá se, že u eukaryotických organismů je fosforylována skoro třetina proteinů. K fosforylaci v nich může dojít na více místech a každá z těchto modifikací má zřejmě rozdílnou regulační funkci [4].

Podle typu fosforylované aminokyseliny se fosfoproteiny dělí do čtyř hlavních skupin. U eukaryot jsou nejběžnějšími tzv. O-fosfáty, kdy dochází k fosforylaci na hydroxylové skupině aminokyseliny a vzniká fosfoester. Tento typ fosforylace je tedy typický pro serin, threonin a tyrosin [5]. Tzv. N-fosfáty, u kterých fosforylaci na  $\text{NH}_2$  skupině vznikají fosfoamidy, se tvoří u histidinu, argininu a lysinu. Do skupiny tzv. acyl-fosfátů se řadí fosforylovaný aspartát a fosforylovaný glutamát, které vznikají fosforylací karboxylové skupiny těchto aminokyselin. Do poslední skupiny tzv. S-fosfátů patří pouze fosforylovaný cystein, který vzniká fosforylací SH skupiny cysteinu za tvorby thioesteru [6].

U eukaryot je reverzibilní fosforylace proteinů zapojena do intracelulárních buněčných drah, které kontrolují téměř všechny aspekty buněčných funkcí, jako jsou růst, dělení a diferenciace buňky, přenos signálu, genová exprese a metabolismus [3].

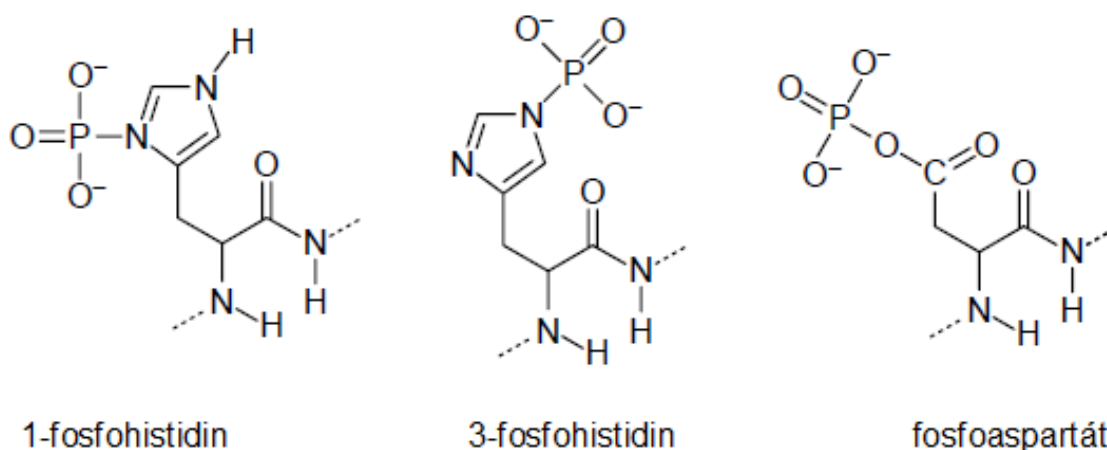




Obr. 1. Obecné schéma fosforylace a defosforylace proteinu. Fosforylaci katalyzuje enzym proteinkinasa, defosforylaci enzym proteinfosfataza. Jako donor fosfátové skupiny je využit ATP [37].

## 2.2. Dvoukomponentní systémy (two-component system, TCS)

Na schopnosti přenést signál o změnách z vnějšího prostředí do vnitřního a správné reakci na něj závisí přežití buňky a tím i celého organismu. Jedním z příkladů těchto signálních mechanismů je přenos signálu využívající fosforylaci histidinu a aspartátu (na obr. 2 jsou v jejich fosforylované formě), tzv. dvoukomponentní systém, který se sice vyskytuje převážně u prokaryotických organismů, ale byl objeven například i u kvasinek, hub a rostlin [2]. Fosfohistidin se zde běžně vyskytuje ve formě dvou izomerů: 1-fosfohistidin a 3-fosfohistidin (obr.2) [7].

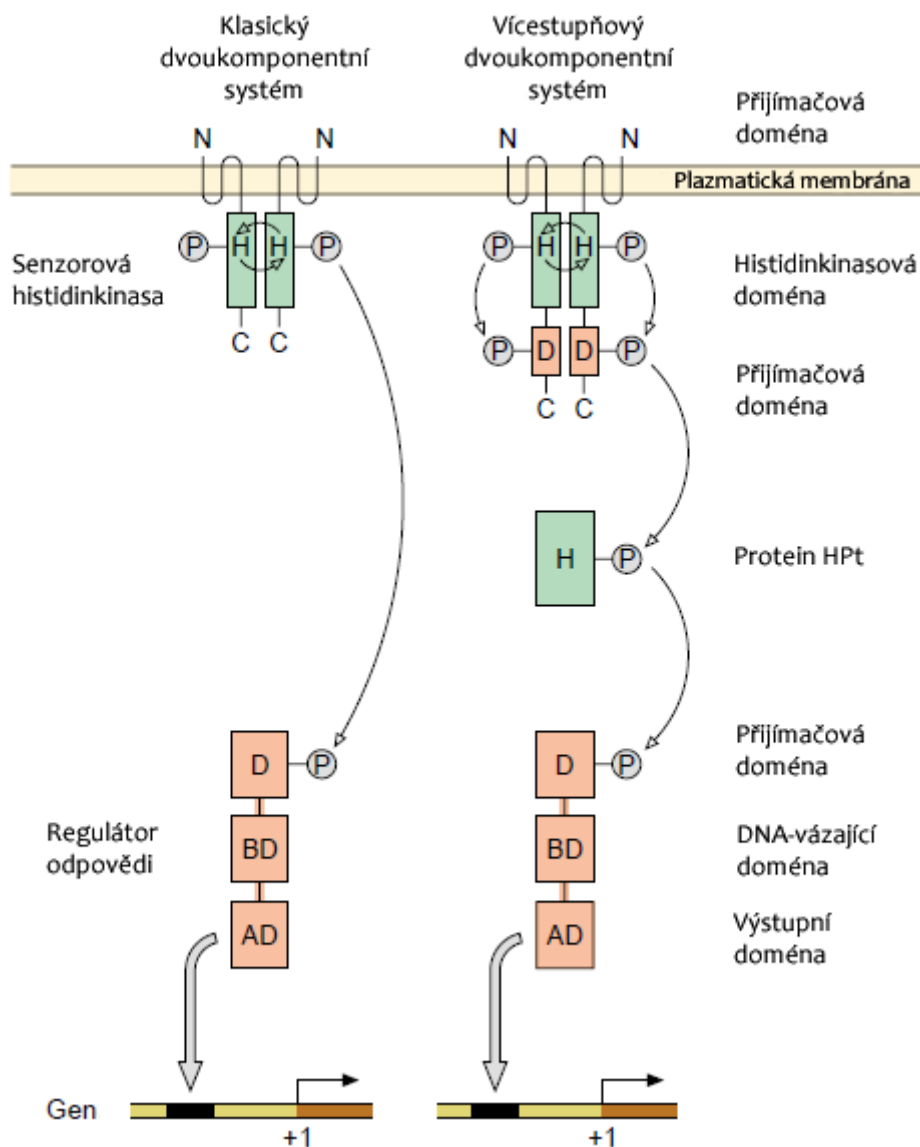


Obr. 2. Aminokyseliny zapojené v His-Asp fosforylaci (v jejich fosforylované formě) [7].

TCS můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na klasické a vícestupňové.

**Klasický dvoukomponentní systém** se skládá pouze ze dvou proteinů – senzoroého proteinu, kterým je transmembránová histidinkinasa (HK) a regulátoru odpovědi (RR, response regulator), který je v cytoplazmě. Většina RR funguje jako transkripční faktory (obr. 3) [7].

**Vícestupňový dvoukomponentní systém** se skládá z hybridní histidinkinasy s připojenou přijímačovou doménou, regulátoru odpovědi a navíc tzv. proteinů HPt (histidin phosphotransfer), které fungují jako spojovací prvek mezi histidinkinasou a regulátorem odpovědi (obr. 3) [7]. Tento systém nacházíme u eukaryot a některých bakterií.



Obr. 3. Schématické znázornění klasického a vícestupňového TCS [7].

### 2.2.1. Tok fosfátu v TCS

Přijetím mimobuněčného signálu (např. změna osmolarity) dojde k aktivaci kinasové domény senzorového proteinu a ke změně jeho konformace. To vede k autofosforylaci konzervativního His gama-fosfátovou skupinou ATP. Poté přijímačová doména regulátoru odpovědi katalyzuje přenos této fosfátové skupiny z fosforylovaného His na svůj konzervativní Asp. Nakonec je fosfátová skupina z Asp hydrolyticky odštěpena při defosforylační reakci. U vícestupňových TCS, které mají navíc dvě další domény, jsou chemické reakce a reakční mechanismy stejné. Všechny tři reakce vyžadují přítomnost  $Mg^{2+}$  iontů [2, 8].

Z chemického hlediska se jedná o tři typy reakcí mezi dvěma fosfoproteiny:

1. autofosforylační:  $HK-His + ATP \leftrightarrow HK-His\sim P + ADP$
2. fosfotransferové:
  - a) klasické systémy TCS:  $HK-His\sim P + RR-Asp \leftrightarrow HK-His + RR-Asp\sim P$
  - b) vícestupňové systémy TCS:  $- HK-His_I\sim P + RR-Asp_I \leftrightarrow HK-His_I + RR-Asp_I\sim P$   
 $- RR-Asp_I\sim P + HPt-His_{II} \leftrightarrow RR-Asp_I + HPt-His_{II}\sim P$   
 $- HPt-His_{II}\sim P + RR-Asp_{II} \leftrightarrow HPt-His_{II} + RR-Asp_{II}\sim P$
3. defosforylační:  $RR-Asp\sim P + H_2O \leftrightarrow RR-Asp + P_i$  [2, 8].

### 2.2.2. Dvoukomponentní systémy a cytokininová signalizace u *Arabidopsis thaliana*

U *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že TCS jsou zapojeny v ethylenové a cytokininové signální dráze a pravděpodobně se účastní i odpovědí na změny osmotických podmínek a odpovědí na některé stresové faktory prostředí [2]. V roce 1993 byla objevena a popsána první histidinkinasa – ethylenový receptor ETR1 [9]. V roce 1998 byly objeveny i zbývající typy „dvoukomponentních proteinů“ AHP (*Arabidopsis* histidin phosphotransfer) a ARR (*Arabidopsis* response regulator) [2]. Sekvenační analýza celého genomu odhalila 8 histidinkinas (AHKs), 5 proteinů HPt (AHPs), 23 regulátorů odpovědi (ARRs) a 9 *pseudo* regulátorů odpovědi, které jsou zapojeny v signálních drahách *Arabidopsis thaliana* [10]. Tato práce je zaměřena na cytokininovou signalizaci, jejímž studiem se v naší laboratoři intenzivně zabýváme.

#### 2.2.2.1. Cytokiny

Cytokiny (CK) jsou jednou z hlavních skupin rostlinných hormonů, které regulují růstové a vývojové procesy rostlin. Přirozeně se vyskytující CK jsou deriváty adeninu a vyskytují se u vyšších rostlin, mečů, u některých řas a bakterií. Byly definovány jako látky, které v přítomnosti dalších fytohormonů auxinů stimulují v některých rostlinných tkáňových kulturách buněčné dělení. Mezi jejich hlavní fyziologické účinky patří potlačování apikální dominance, indukce regenerace orgánů, zpomalení stárnutí, udržování vysoké metabolické aktivity rostlinných pletiv a další [11].

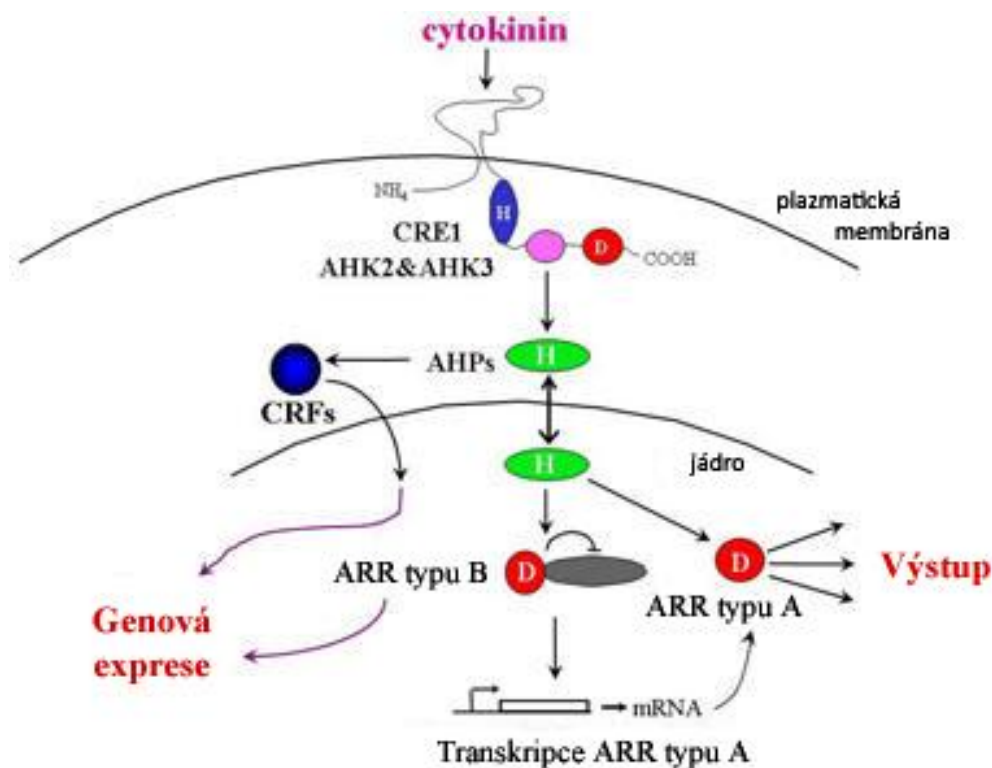
### 2.2.2.2. Cytokininová signalizace u *Arabidopsis thaliana*

Cytokininová signální dráha je obdobou dvoukomponentních fosforylačních drah u bakterií [12].

U *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány tři hybridní histidinkinasy, které slouží jako cytokininové receptory (*Arabidopsis* histidine kinase). Jsou to AHK2, AHK3 a AHK4/CRE1/WOL (*Arabidopsis* histidine kinase 4/cytokinin response/wooden leg) [10]. Tyto receptory jsou lokalizovány na plazmatické membráně (obr. 4) [13]. Obsahují konzervativní extracelulární doménu pro vazbu cytokininu, tzv. doménu CHASE (cyclases/histidine kinases associated sensory extracellular), dále pak histidinkinasovou a přijímačovou doménu. Vazba cytokininu na doménu CHASE AHK2, AHK3 nebo AHK4/CRE1/WOL aktivuje autofosforylaci konzervativního histidinu proteinkinasové domény těchto receptorů. Následuje intramolekulární přenos fosfátové skupiny na konzervativní aspartát přijímačové domény receptoru [14].

Poté je fosfátová skupina přenesena na histidin jednoho z pěti proteinů AHP (AHP1 – AHP5), které pak putují do jádra, kde předávají fosfát proteinům ARR (obr. 4). Existují dvě hlavní skupiny proteinů ARR. ARR typu B fungují jako transkripční faktory a aktivují transkripci primárních genů odpovědi na cytokininový signál (obr. 4). Mezi ně patří například geny pro proteiny ARR typu A a proteiny CRF (cytokinin response factors). Proteiny ARR typu A fungují jako negativní zpětná vazba, která vede k oslabení odpovědi na cytokininový signál (obr. 4). [13, 15, 16]. Proteiny CRF po aktivaci proteiny AHP putují do jádra, kde spouští transkripci svých cílových genů (obr. 4) [13].

Přenos fosfátu od proteinů AHK k proteinům ARR byl prokázán *in vitro* nebo pomocí uměle sestavené cytokininové dráhy v bakteriích a kvasinkách [14, 17-19].



Obr. 4. Schéma přenosu signálu cytokininů. Po navázání cytokininu na AHK doménu dochází k její autofosforylaci a poté je fosfátová skupina pomocí proteinů AHP přenášena na proteiny ARR umístěné v jádře [38].

### 2.2.3. Stabilita fosfohistidinu

V současnosti je známo, že histidinová fosforylace tvoří asi 6 % z celkového počtu fosfoproteinů [1, 20]. Vznik fosfohistidinu je narušen od vzniku fosfoserinu a fosfothreoninu vysoce reverzibilní proces. Fosfoesterové vazby jsou stabilnější než fosfoamidové obsažené právě ve fosfohistidinech, kde fosfátová skupina vázaná na dusík imidazolu představuje vysokoenergetickou vazbu [5, 21, 22].

Na stabilitu fosfohistidinu má velký vliv pH prostředí, ve kterém se vyskytuje. Narozdíl od zásaditého je fosfohistidin v kyselém prostředí silně nestabilní a rychle se rozpadá. Podobně nestabilní je např. fosfoaspartát. Naproti tomu např. fosfoserin, fosfothreonin a fosfotyrosin jsou v kyselém prostředí stabilní (tab. 1) [1].

Tab. 1. Porovnání stability fosforylovaných aminokyselin

	kyselé prostředí	zásadité prostředí
fosfoserin	Stabilní	nestabilní
fosfothreonin	Stabilní	nestabilní
fosfotyrosin	Stabilní	stabilní
fosfohistidin	silně nestabilní	stabilní
fosfoaspartát	Nestabilní	nestabilní
fosfoglutamát	Nestabilní	nestabilní
fosfoarginin	Nestabilní	stabilní
fosfolysin	Nestabilní	stabilní
fosfocystein	Stabilní	stabilní

Při běžných analýzách fosfoproteinů, jako například extrakce proteinů precipitací kyselinou trichloroctovou, hmotnostní spektrometrie nebo barvení separačních gelů, se používá kyselé prostředí [21]. To je při studiu fosforylace histidinu a příslušné histidinkinasy problém a díky své nestabilitě v tomto prostředí zůstává fosfohistidin často neidentifikovaný. Je proto možné, že proteiny fosforylované na histidinu představují širší skupinu, než se nyní předpokládá [5, 20].

Kvůli problémům se stabilitou nelze metody, které jsou běžné pro studium většiny fosfoproteinů využít nebo je nutné tyto metody modifikovat. Ve snaze zvýšit stabilitu fosfohistidinu byl v některých metodách dvouvalentní kyslíkový atom fosfátové skupiny nahrazen atomem síry. Thiofosfohistidin je stabilnější v kyselém prostředí a je tedy možné použít některé klasické fosfoproteinové purifikační techniky [21].

### 2.3. Současné metody studia fosforylace a přenosu fosfátu

Pro analýzu fosforylace proteinů neexistuje jedna univerzální technika, je nutné pro každý fosfoprotein vybrat tu správnou individuální strategii. Klíčovými parametry ovlivňujícími volbu vhodné metody jsou množství proteinu, typ aminokyseliny, která je fosforylována, zda je

k dispozici čistý fosfoprotein nebo komplexní směs proteinů a v neposlední řadě druh informace, kterou chceme získat [3].

Hlavními problémy při studiu fosforylace je její obecně nízký rozsah, velmi malé absolutní množství fosfoproteinu v buňce v daném okamžiku a to, že protein může existovat v několika různých fosforylovaných formách. Během přípravy, manipulace se vzorkem a analýzy vzorku může docházet k odpadnutí (uvolnění) fosfátu fosfoproteinu. V posledních letech byla vyvinuta a optimalizována celá řada metod, které se snaží odstranit nebo alespoň zmírnit výše uvedené komplikace [3].

Při studiu fosfoproteinů a fosfopeptidů se analyzuje zejména místo fosforylace a množství proteinu ve fosforylovaném stavu. Na stanovení fosfoproteinů existuje několik metodických přístupů [3].

Tradiční metody identifikace fosfoproteinů zahrnují enzymové značení proteinu radioaktivně značeným fosfátem, kdy jsou fosfopeptidy detekovány díky získané radioaktivitě. Další skupinu tvoří metody kolorimetrické, které jsou jednak založeny na barevných reakcích uvolněného fosfátu přímo v gelu, popř. v kapalném vzorku, nebo se využívá barvení fosfoproteinů v gelu fluorescenčními barvami (Pro-Q Diamond).

V poslední době zaujímají ve fosfoproteomové analýze výhradní místo metody založené na hmotnostní spektrometrii (Mass spectrometry, MS). MS poskytuje informaci o molekulové hmotnosti, která je charakteristická pro každé chemické individuum. Vzhledem k tomu, že každá PTM proteinu mění jeho hmotnost, zdá se být MS pro analýzu ideální [3].

### 2.3.1. Metody hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje. Pro přechod částic do plynné fáze se dnes uplatňují především dva postupy:

**Metoda ESI (Electrospray Ionization)** – na ústí kapiláry, z níž pomalu vytékají jednotlivé frakce separovaných molekul, se aplikuje vysoký elektrický potenciál, který umožní náhlé odpaření a ionizaci molekul. Tento způsob ionizace umožňuje studium nativních molekul, její nevýhodou je relativně vysoký náboj iontů [39].

**Metoda MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation)** – studovaná látka (nebo směs látek) se nechá vykrytalovat na kovové podložní desce s tzv. matricí. Po ozáření krystalů laserem dojde k jejich desorpci a ionizaci [39].

Obě tyto metody jsou do té míry šetrné, že při nich nedochází k fragmentaci ani velkých bílkovinných molekul [39].

#### 2.3.1.1. Identifikace bílkovin metodou peptidového mapování

Každá fosfátová skupina, která se naváže na protein, zvýší jeho molekulovou hmotnost o 80 hmotnostních jednotek, tzv. Daltonů (Da). Změřením molekulové hmotnosti daného fosfoproteinu a porovnáním s molekulovou hmotností nemodifikovaného proteinu, popř. proteinu defosforylovaného fosfatasou, je možné určit průměrný počet fosfátů navázaných na polypeptidový řetězec. Pro získání přesnější informace je nutné podrobit protein proteolýze a pracovat s jeho fragmenty – peptidy.

Na hmotnostním spektru peptidů – peptidové mapě – je vidět fosfopeptidové kandidáty jako píky s molekulovou hmotností vyšší o násobky 80 Da než by příslušelo nemodifikovanému

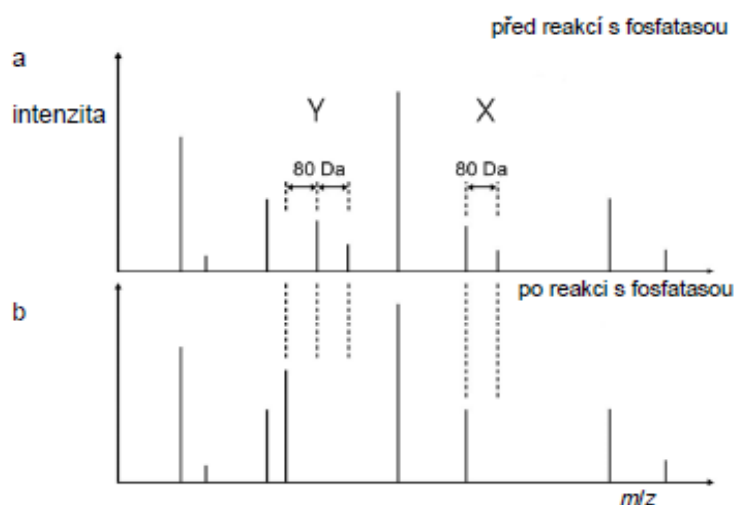
peptidu. Mnohem průkaznější je porovnání peptidových map získaných před a po reakci s alkalickou fosfatase (obr. 6). Defosforylaci proteinu je možné provést přímo na terčiku MALDI [3].

Pro lepší výsledek se používá kombinace MALDI-TOF (Time Of Flight), kdy ionty vstupují do vakuované letové trubice 1 až 2 m dlouhé. Na detektor dopadají ionty postupně od nejlehčích po nejtěžší [39].

Pro studium fosforylace histidinu není klasická MS vhodná, protože se fosfát z histidinu díky své nestabilitě při ionizaci ztrácí.



Obr. 5. Schéma identifikace proteinů z gelu po elektroforese (nejdříve jsou proteiny separovány pomocí 1D nebo 2D elektroforézy, poté následuje vlastní MS analýza) [40].



Obr. 6. Srovnání hmotnostních spekter MALDI-TOF a) před reakcí vzorku s fosfatase a b) po reakci s fosfatase [3].

### 2.3.2. Metody pro studium histidinové fosforylace

Tato bakalářská práce je zaměřena na metody, které je možno využít k detekci histidinové fosforylace a tím ke studiu přenosu fosfátu v rámci cytokininové signální dráhy.

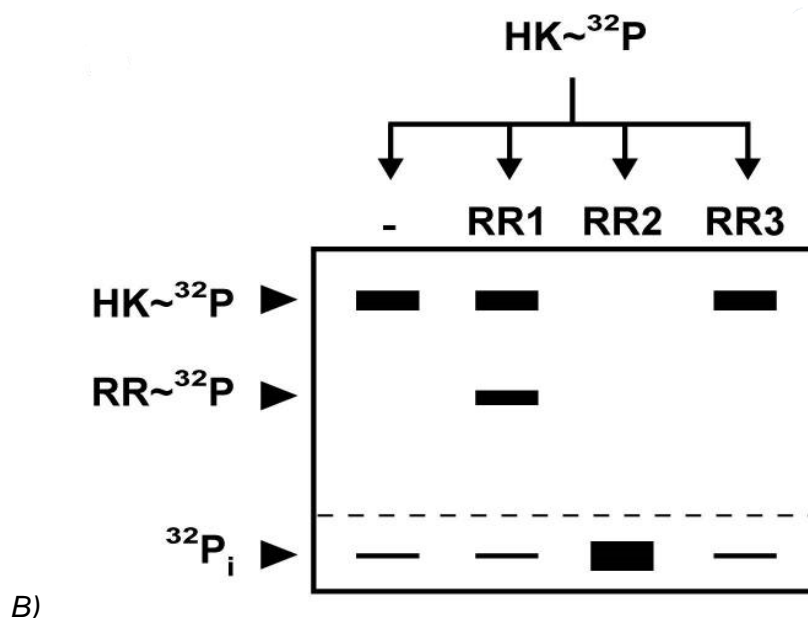
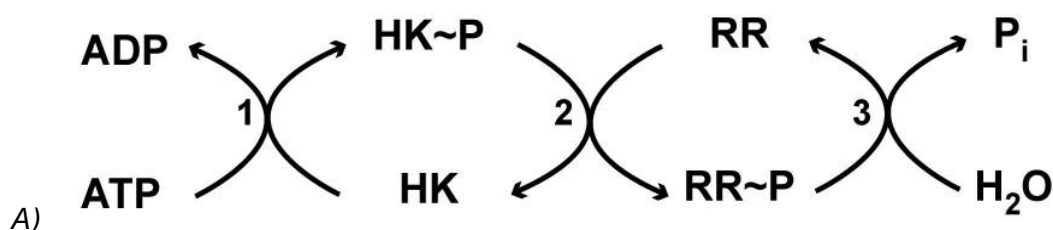
Metody uvedené v dalším textu lze buď přímo nebo po modifikaci použít pro analýzu histidinové fosforylace.

### 2.3.2.1. Metody radioaktivního značení

Protein je nejprve označen pomocí radioaktivně značeného fosfátu (např.  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , acetyl $^{32}\text{P}$ fosfát) a poté je separován pomocí SDS-PAGE nebo nativní PAGE. Díky své radioaktivitě je detekován přímo v gelu a je možné jej i kvantifikovat [23-25].

Metoda značení pomocí  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  již byla využita při studiu dvoukomponentních systémů bakterií. Histidinkinasy byly nejdříve autofosforylovány inkubací s  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  za přítomnosti  $\text{MgCl}_2$  a za alkalického pH. Poté byly inkubovány s regulátory odpovědi. Přenos fosfátu byl následně sledován ve směsi fosforylovaných HK a RR pomocí SDS PAGE s následnou autoradiografií. V experimentu byly zachyceny tři oddělené reakce: autofosforylace HK, přenos fosfátu na RR a defosforylace RR (obr. 7. A a B). Defosforylace RR probíhá díky vysoké fosfatasové aktivitě (buď autofosfatasové nebo katalyzované HK), což se projeví uvolněním fosfátu jak z HK, tak z RR [24, 25].

Podobně jako značení pomocí  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  byla při studiu bakteriálních TCS použita metoda využívající k fosforylaci acetyl $^{32}\text{P}$ fosfát. Jedná se o nízkomolekulární donor fosfátu, který je schopen přímo fosforylovat regulátory odpovědi. Fosforylace RR probíhá inkubací s acetyl $^{32}\text{P}$ fosfátem při neutrálním pH za přítomnosti hořčičných iontů. Poté jsou fosforylační produkty sledovány autoradiograficky na polyakrylamidových gelech [26].



Obr. 7. Schéma fosforylačních a defosforylačních reakcí u TCS (A) a výsledek těchto reakcí znázorněný na SDS-PAGE gelu (B). Jsou zde zachyceny reakce tří různých RR s fosforylovanou HK (B): u RR1 došlo k jeho fosforylaci, u RR2 došlo k defosforylaci obou proteinů a v případě RR3 je výsledek stejný jako u kontroly (pouze fosforylovaná HK) [25].



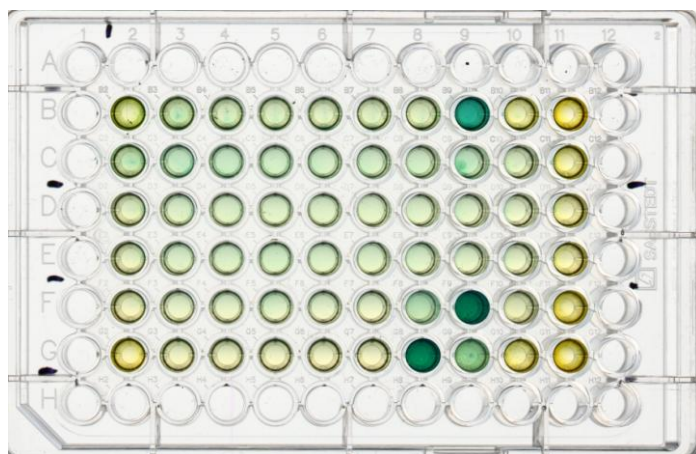
### 2.3.2.2. Metody kolorimetrické

Principem těchto metod je stanovení množství anorganického fosfátu, uvolněného z vazby na histidin v molekule proteinu díky kyselému prostředí, ve kterém reakce probíhá [27].

Řada kolorimetrických metod je založena na tvorbě kyseliny fosfomolybdenové, která je v dalším kroku buďto redukována vybraným redukčním činidlem (např. hydrochinon, aminonaftolsulfonová kyselina), což vede ke změně barvy (vzniká „molybdenová modř“), nebo se vytvoří barevné komplexy navázáním barviv, jako jsou např. malachitová zeleň, krystalická vilet' nebo quinaldinová červeň [28]. Citlivost těchto metod je poměrně velká, např. u stanovení pomocí malachitové zeleně je to 0,2 nmol  $P_i$  [27].

Do skupiny kolorimetrických metod můžeme zařadit i metodu srážecí, která má podobný princip. Nejprve reakcí mezi fosfátem a molybdenanem amonným vznikne fosfomolybdenan amonný. Poté za alkalického pH nahradí triethylamin amonnou skupinu ve fosfomolybdenanu a vytvoří s ním komplex – sraženinu. Tato metoda je citlivější než např. detekce fosfátu malachitovou zelení, její detekční limit je 10 pmol  $P_i$ /mm<sup>2</sup> [28].

Analýzu fosforylace proteinů pomocí kolorimetrických metod lze provést buď v polyakrylamidovém gelu, což slouží spíše pro detekci fosforylace, nebo v mikrotitračních destičkách (s výjimkou srážecí metody, obr. 8). V těch lze fosforylaci dobře i kvantifikovat změřením absorbance ve všech jamkách. [27, 29, 30].



Obr. 8. Kolorimetrické stanovení  $P_i$  metodou barvení malachitovou zelení v mikrotitrační destičce (ilustrační obrázek).

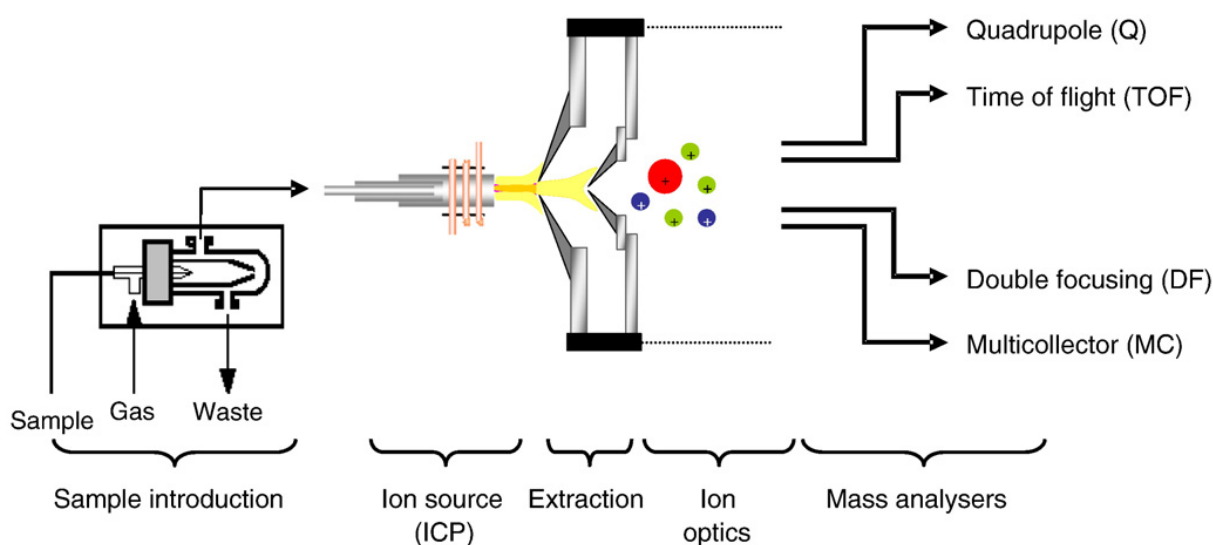
### 2.3.2.3. ICP-MS

ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectroscopy) neboli hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je analytická metoda, která slouží ke stanovení obsahu stopových množství jednotlivých prvků v analyzovaném vzorku. Tato technika je velmi citlivá, rychlá a umožňuje relativně přesně analyzovat téměř všechny prvky od lithia po uran [41].

Vzorek je analyzovaný většinou v kapalně formě. Pomocí peristaltické pumpy je vstřikován ve formě aerosolu do ionizátoru (obr. 9), kde je jako zdroj iontů využito indukčně vázané plazma (vysoce ionizovaný plyn) s různými zónami teplot. Při průchodu těmito zónami je

vzorek postupně vysušen, odpařen, atomizován a ionizován (obr. 9). V tzv. analytické zóně plazmy, která má teplotu 6000-7000 K, se nakonec nachází největší zastoupení nabitých iontů obsažených ve vzorku. Poté jsou tyto ionty pomocí jednoho nebo více hmotnostních analyzátorů (např. kvadrupól nebo TOF, obr. 9) rozděleny podle jejich relativní atomové hmotnosti, takže na detektor po nastavení specifických podmínek dopadají vždy pouze částice o definované hmotě. Po detekci jsou shromážděná data převedena do výsledného hmotnostního spektra analyzovaného vzorku [31].

Vzhledem k tomu, že je metoda ICP-MS schopná detekovat i velmi nízké hladiny fosforu ve vzorku, lze tuto metodu využít k identifikaci a i kvantifikaci fosforylace proteinů. Pro analýzu je potřeba mít protein v nejvyšší čistotě a při jeho přípravě je potřeba vyvarovat se použití fosfátových pufrů.



Obr. 9. Schéma ICP-MS instrumentace. Vzorek je ve formě aerosolu vstřikován do ionizátoru, kde dojde k jeho ionizaci. Poté jsou ionty pomocí hmotnostních analyzátorů rozděleny podle jejich relativní atomové hmotnosti a následně detekovány [31].

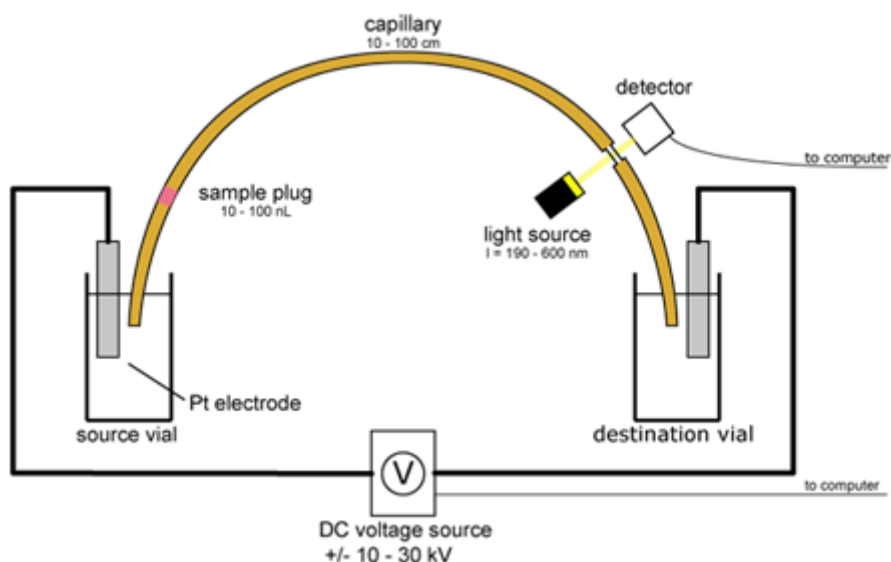
#### 2.3.2.4. CE-LIF

Kapilární zónová elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (Capillary Zone Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection) má velký význam při analýzách biomolekul. Je to vysoce účinná elektromigrační separační metoda, která je schopna detekovat i ojedinělé molekuly a k provedení analýzy stačí jen malé množství vzorku [32-34]. Principem metody je nejprve separace molekul v gelu podle jejich molekulové hmotnosti a poté jejich detekce (obr. 10). K té dochází změnou absorbance díky obsažené fluorescenci při průchodu detektorem. Výsledek je prezentován ve formě elektroforeogramu (obr. 11) [32, 34].

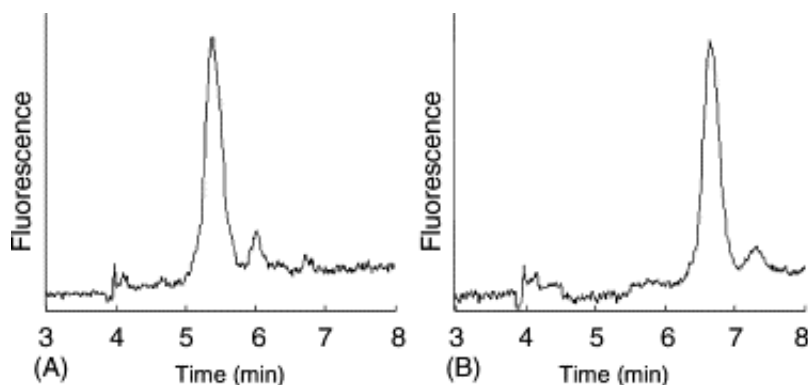
Dostatečně silnou přirozenou fluorescenci mají pouze proteiny, které obsahují tyrosin, tryptofan nebo fenylalanin. V případě slabé fluorescence je proto nutné začlenit do jejich struktury vhodný fluorofor [32, 34].

Při studiu proteinové fosforylace lze využít značení pomocí zeleně fluoreskujícího proteinu (GFP, green fluorescent protein), díky němuž můžeme mimo jiné sledovat signální dráhy v bakteriích, rostlinách nebo živočišných buňkách. GFP je kyselé globulární protein

o molekulové hmotnosti 27 kDa, který je v buňkách lehce detekovatelný a je výhodou, že jeho excitační spektrum je ve viditelné oblasti a lze tedy k excitaci použít běžný argonový laser [33]. Další výhodou je, že k analýze nepotřebujeme izolovaný čistý protein, ale můžeme použít proteinový lyzát, který obsahuje studovaný protein fúzovaný se zeleně fluoreskujícím proteinem. Můžeme tak díky specifické detekci fúzního partnera (GFP) analyzovat zastoupení jednotlivých forem (fosforylovaných/nefosforylovaných) proteinu přímo například z rostlinného materiálu.



Obr. 10. Schéma CE-LIF instrumentace. Molekuly vzorku jsou při průchodu kapilárou elektroforeticky rozděleny podle své molekulové hmotnosti a poté jsou detekovány díky změně absorbance, závislé na obsahu fluorescence, při průchodu detektorem [42].



Obr. 11. Výsledný elektroforeogram proteinu ERK2 fúzovaného s GFP: nefosforylovaná forma proteinu (A) a fosforylovaná forma (B) [33].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)

Elektroforetická separace proteinů byla provedena za denaturačních podmínek. Byly použity 15% SDS polyakrylamidové gely v diskontinuálním uspořádání. V koncentračním gelu došlo k zkoncentrování proteinů, v separačním k jejich vlastnímu rozdělení.

Tyto gely byly použity pro kolorimetrické stanovení fosfátu a pro westernový přenos s následnou imunodetekcí proteinů při testování produkce proteinu.

##### Přístroje:

Aparatura Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, USA)  
Zdroj napětí PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

##### Příprava gelu pro 15% SDS PAGE:

###### Separační gel

1,25 ml 4 x koncentrovaného 1,5 M Tris-Cl pH 8,8  
1,2 ml ddH<sub>2</sub>O  
2,5 ml roztoku Rotiphorese gel 30 (30 % akrylamid a 0,8 % bisakrylamid, ROTH, Německo)  
50 ml 10% roztoku SDS  
50 µl 10% roztoku APS  
3 µl TEMED (N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin)

Napipetovaná směs byla dobře promíchána, nalita mezi připravená skla necelé 2 cm pod okraj a převrstvena vodou, aby polymerační reakce probíhala bez přístupu kyslíku. Doba polymerace byla asi 30 min.

###### Koncentrační gel

400 µl 4 x koncentrovaného 0,5 M Tris-Cl pH 6,8  
800 µl ddH<sub>2</sub>O  
250 µl roztoku Rotiphorese gel 30 (30 % akrylamid a 0,8 % bisakrylamid ROTH, Německo)  
16 µl 10% roztoku SDS  
25 µl 10% roztoku APS  
1 µl TEMED (N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin)

Voda použitá k převrstvení byla odstraněna, prostor byl vysušen a naplněn směsí pro koncentrační gel, do které byl ihned vložen hřebíček. Polymerace probíhala asi 20 min.

##### Příprava vzorků pro elektroforézu:

###### 4x koncentrovaný SDS nanášecí pufr:

200 mM TrisCl pH 6,8  
400 mM DTT

8 % SDS  
0.4 % bromfenolová modř  
35 % glycerol

Ke vzorku byl přidán 4 x koncentrovaný SDS nanášecí pufr a byl inkubován 10 min při 95 °C.

#### **Elektroforéza:**

##### **Elektroforetický pufr:**

25 mM Tris-Cl pH 8,3  
192 mM glycin,  
0,1 % SDS

Připravené gely byly vloženy do aparatur naplněných elektroforetickým pufrům. Vzorky byly nanášeny do jamek gelu pod hladinou pufru.

Napětí pro elektroforézu v koncentrační části gelu bylo nastaveno 15 mA a pro separační část 30 mA.

### **3.2. Barvení molybdenanem amonným a malachitovou zelení**

Pomocí inkubace polyakrylamidového gelu v roztocích se zvyšující se koncentrací  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  byla stanovena přibližná citlivost barvení malachitovou zelení a poté byla testována přítomnost fosfátu v proteinových vzorcích.

#### **Roztoky:**

##### **Zásobní roztok malachitové zeleně:**

60 ml konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
doplnit dd $\text{H}_2\text{O}$  do 300 ml  
440 mg malachitové zeleně

##### **Pracovní roztok malachitové zeleně:**

1 díl zás. roztoku  
1 díl ředěné  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 díl  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 5 dílů dd $\text{H}_2\text{O}$ )

##### **Barvicí roztok:**

10 ml prac. roztoku  
2,5 ml 7,5% molybdenanu amonného  
0,2 ml 11% Tween 20  
Připravuje se před každým barvením čerstvý.

##### **Fixační roztok:**

25 % ethanol  
2 % glycerol

### 3.2.1 Určení citlivosti metody

Pro přibližné určení citlivosti barvení byly použity čtverečky polyakrylamidového gelu (15% SDS PAGE) o straně asi 1 cm.

Gely byly inkubovány 3 h v roztocích  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o stoupající koncentraci (2  $\mu\text{M}$  – 2 mM). Jako kontrola byla použita čistá  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Během inkubace byly roztoky vždy po hodině vyměněny. Poté byly všechny gely propláchnuty  $\text{ddH}_2\text{O}$  a inkubovány 10 min v barvicím roztoku malachitové zeleně. Po skončení barvení byly přeneseny do fixačního roztoku, naskenovány a vysušeny.

### 3.2.2. Barvení vzorků proteinů

Nejprve byly vzorky proteinů separovány pomocí 15% SDS PAGE. Poté byl gel vložen na 10 min do barvicího roztoku, zafixován, naskenován a vysušen.

### 3.2.3. Vymytí SDS z gelu

Po skončení elektroforézy byly testovány tři způsoby vymytí SDS z gelu:

#### 1. Vymytí SDS pomocí isopropanolu

Gel byl nejprve ponořen na 10 min do  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Odtud byl přenesen na 10 min do roztoku obsahujícího 25 % isopropanolu a 10 % kyseliny octové, poté na 10 min do roztoku 25% isopropanolu a nakonec promytý čistou  $\text{ddH}_2\text{O}$  a obarven v roztoku malachitové zeleně.

#### 2. Vymytí SDS pomocí $\text{ddH}_2\text{O}$

Gel byl promýván 4 x 15 min čistou  $\text{ddH}_2\text{O}$  a obarven v roztoku malachitové zeleně.

#### 3. Vymytí SDS pomocí 1% Tritonu X-100

Gel byl nejprve opláchnut  $\text{ddH}_2\text{O}$ , poté inkubován 15 min v Tritonu X-100 a nakonec opět opláchnut  $\text{ddH}_2\text{O}$ . Následně byl obarven v roztoku malachitové zeleně.

## 3.3. Příprava lyzátu pro CE-LIF

Pro přípravu konstruktů obsahujícího gen pro protein AHP5 ve fúzi s GFP byl použit vektor *pET 161 DEST* (Invitrogen, USA).

Následně byl připravený konstrukt transformován do bakteriálního expresního kmene *E. coli BL21 Star (DE3) One Shot* (Invitrogen, USA). Ten umožňuje regulovatelnou expresi genu *AHP5-GFP*.

### Přístroje, materiál a roztoky:

Inkubovaná třepačka Multitron II (HT Infors, Švýcarsko)

Ultracentrifuga Avanti J-30I (Beckman, USA)

Sonikátor Ultrasonics UP 100 H, sonda MS7 (Hielscher, Německo)

**TB médium (Terrific Broth medium) (1 litr):**

12 g trypton

24 g kvasniční výtažek

4 ml glycerol

900 ml ddH<sub>2</sub>O

Po sterilizaci autoklávováním a zchladnutí na 55 °C přidáno:

100 ml K-fosfátu pH 7,5

Selekční antibiotikum ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg.ml<sup>-1</sup>)

**K-fosfát pH 7,5 (1 litr):**

23,1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

125,4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**1M IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid)**

Do 1 litru TB média bylo inokulováno 200 µl kultury ze zásobního bakteriálního štoku. Růst probíhal přes noc na třepačce (200 otáček/min) a teplotě 37 °C. Po dosažení OD<sub>600</sub> 0,6 byla přidáním 400 µl 1 M IPTG zahájena indukce exprese, která probíhala 3 hodiny při stejných otáčkách, ale za teploty snížené na 22 °C. Kultura byla poté stočena 20 minut při 3 500 g a 4 °C.

Bakteriální pelet z 1 litru kultury byl rozsuspendován ve 20 ml nativního lyzačního pufru (20 mM Tris-HCl pH 7,9) při 4 °C a lyzován ultrazvukovými pulzy (35 W, 6 x 1 minuta) za současného chlazení ledem. Po ukončení lyze byl vzorek zcentrifugován 30 min při 48 000 g a získaný supernatant obsahující rozpustnou frakci bakteriálních proteinů byl zamražen na -20 °C (krátkodobě, asi 1 měsíc) a -80 °C (dlouhodobě, asi 1 rok).

**3.4. Westernový přenos**

Touto metodou byl proveden přenos proteinů z polyakrylamidových gelů na membránu PVDF pomocí elektrotransferu tzv. „semidry“ technikou. Specifické detekce proteinu bylo dosaženo nepřímo použitím série dvou protilátek.

Množství nativního proteinového lyzátu dávkovaného na jamku při SDS PAGE bylo 60 µg.

**Elektrotransfer:****Přístroje, materiál a roztoky:**

Zdroj napětí Power Pac P25 (Biometra, Německo)

Aparatura pro „semidry“ elektrotransfer: Fast blot 33 (Biometra, Německo).

Filtrační papír (Whatman 3 MM), 4 kusy o 1 cm na každé straně větší než gel

Membrána PVDF (Immobilon™), 1 kus o 0,5 cm na každé straně větší než gel

Metanol

**Transferový pufr:**

25 mM Tris-Cl pH 8,3

150 mM glycin

10 % metanol

Membrána byla ekvilibrována ponořením do metanolu ke snížení hydrofobicity a následně promývána 5 minut v ddH<sub>2</sub>O. Membrána, papíry i gel byly poté odděleně inkubovány 10 minut v transferovém pufru.

Na povrch anody byly položeny dva filtrační papíry, membrána, gel a nakonec opět dva filtrační papíry. Po přiložení víka s katodou byl zapojen zdroj. Proud byl nastaven na napětí 5 mA/cm<sup>2</sup> membrány a elektrotransfer probíhal 30 minut.

#### **Imunodetekce:**

#### **Přístroje, materiál a roztoky:**

Kývačka – Biometra WT 12  
Plastikové vaničky

#### **TBST:**

50 mM Tris-Cl pH 8,0  
150 mM NaCl  
0,1 % Tween-20

#### **Blokační pufr:**

5% mléko v TBST  
100ml: 5 g odtučněného sušeného mléka + 95 g TBST

#### **Protilátky:**

**Primární protilátka:** Anti GFP (Roche, Švýcarsko) (v ředění 1:1000)

**Sekundární protilátka:** Anti Mouse IgG (Sigma, USA) konjugovaná s alkalickou fosfatázou (v ředění 1:20 000)

Obě protilátky byly ředěny v blokačním pufru.

#### **Detekční pufr:**

100 mM Tris-Cl pH 9,5  
100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **Roztok chromogenního substrátu:**

30 ml detekčního pufru bylo smícháno se 150 µl NBT (4-nitroblue tetrazolium, 100 mg/ml v 70% DMF) a 100 µl BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát, 50 mg/ml ve 100% DMF). Tento substrát je senzibilní na světlo.

Po dokončení přenosu proteinů byla membrána nejprve inkubována po dobu 1 hodiny v blokačním pufru a poté byla přenesena na 1 hodinu do roztoku primární protilátky. Následně byla promyta 3 x 5 minut v roztoku TBST a inkubována 1 hodinu v roztoku sekundární protilátky značené alkalickou fosfatázou. Po promytí 3 x 5 min v roztoku TBST byla membrána vložena na 10 minut do roztoku detekčního pufru a z něj přenesena do barvicího roztoku, který obsahoval chromogenní substrát. Vizualizace probíhala za nepřítomnosti světla dokud se na membráně neobjevily zbarvené proužky (několik minut). Reakce byla zastavena promytím membrány ddH<sub>2</sub>O. Nakonec byla membrána vysušena pomocí filtračního papíru



## 4. VÝSLEDKY

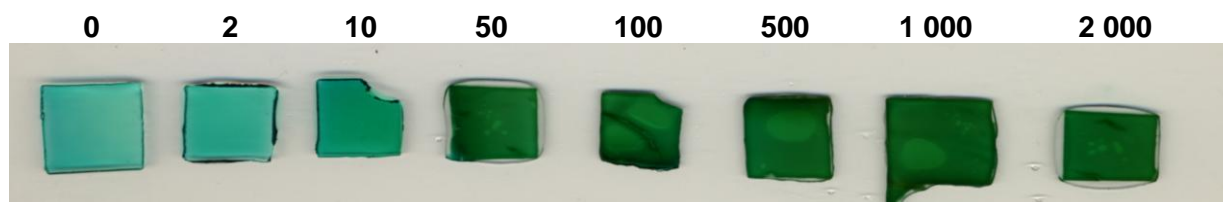
### 4.1. Barvení molybdenanem amonným a malachitovou zelení

#### 4.1.1. Kalibrační řada

Nejprve bylo nutné ověřit si citlivost detekce fosfátu inkubací polyakrylamidových gelů ve zvolených koncentracích roztoků  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2, 10, 50, 100, 500, 1000 a 2000  $\mu\text{M}$ ). Koncentrace byly přepočítány na jednotky  $\text{pmol}/\text{mm}^2$  gelu a odpovídají použitým molárním koncentracím.

Na obarvených gelech je vidět změna zbarvení proti kontrole (0  $\text{pmol KH}_2\text{PO}_4/\text{mm}^2$ ) u 10  $\text{pmol KH}_2\text{PO}_4/\text{mm}^2$  (obr. 12), nižší koncentrace  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (kolem 2  $\text{pmol}/\text{mm}^2$ ) už by pravděpodobně nebylo možné detekovat.

U hodnot 50-2000  $\text{pmol KH}_2\text{PO}_4/\text{mm}^2$  nelze jednotlivé koncentrace rozlišit, zbarvení se zdá být neměnné. Nejlépe lze pouhým okem rozlišit rozdíly ve zbarvení mezi 10 – 50  $\text{pmol KH}_2\text{PO}_4/\text{mm}^2$  (obr. 12).

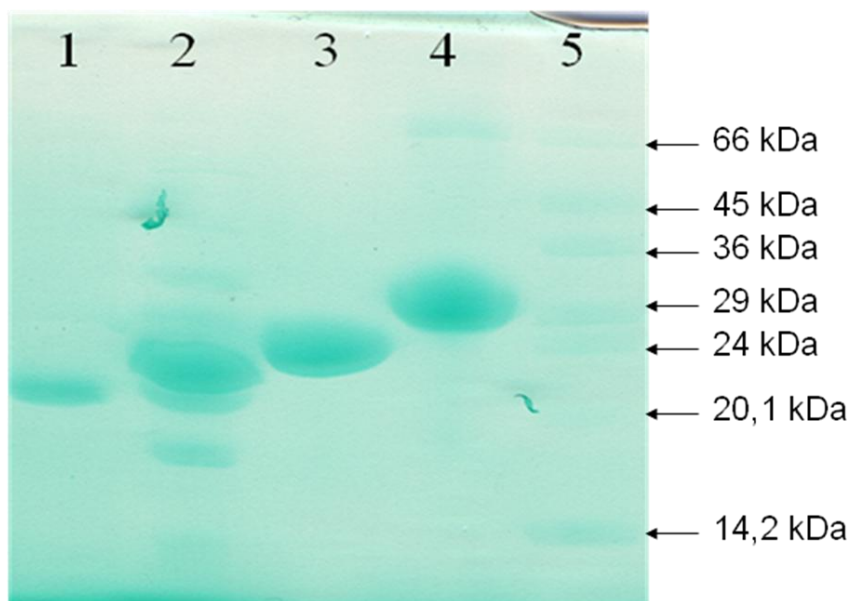


Obr. 12. Určení citlivosti barvení malachitovou zelení (koncentrace  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v  $\text{pmol}/\text{mm}^2$  jsou uvedeny nad obrázkem).

### 4.2. Barvení vzorků proteinů

Pro vlastní barvení byly použity předem připravené purifikované proteiny AHP2 (molekulová hmotnost 22,3 kDa), AHP5 (molekulová hmotnost 22,7 kDa) a CKIrd (molekulová hmotnost 23,3 kDa), jako kontrolní vzorek byl použit kasein (Sigma, USA, molekulová hmotnost 25 kDa). Množství dávkované na jamku při SDS PAGE bylo 20  $\mu\text{g}$  purifikovaného proteinu.

Na polyakrylamidovém gelu je vidět, že malachitová zeleň obarvila všechny proteiny, včetně kontrolních a standardu (obr. 13). Z toho lze usoudit, že barvení proběhlo nespecificky. Získáním dalších informací z literatury bylo zjištěno, že přítomnost SDS způsobuje falešně pozitivní výsledek barvení, a proto bylo nutné se zaměřit na jeho odstranění.



Obr. 13. 15% SDS polyakrylamidový gel barvený malachitovou zelení. Na gel bylo nanášeno 20  $\mu$ g proteinu: AHP2 (dráha 1), AHP5 (dráha 2), CKI1rd (dráha 3), kasein (dráha 4) a hmotnostní standard (dráha 5).

#### 4.2.1. Vymývání SDS z gelu

Z výše uvedených důvodů byly vyzkoušeny tři způsoby pro odstranění SDS z gelů. Pro testování byly použity tři proteiny – předem připravený purifikovaný protein AHP5 a jako kontroly albumin (Sigma, USA, molekulová hmotnost 67 kDa) a BSA (SERVA, Německo, molekulová hmotnost 66,4 kDa). Množství proteinu dávkovaného na jamku při SDS PAGE bylo 20  $\mu$ g.

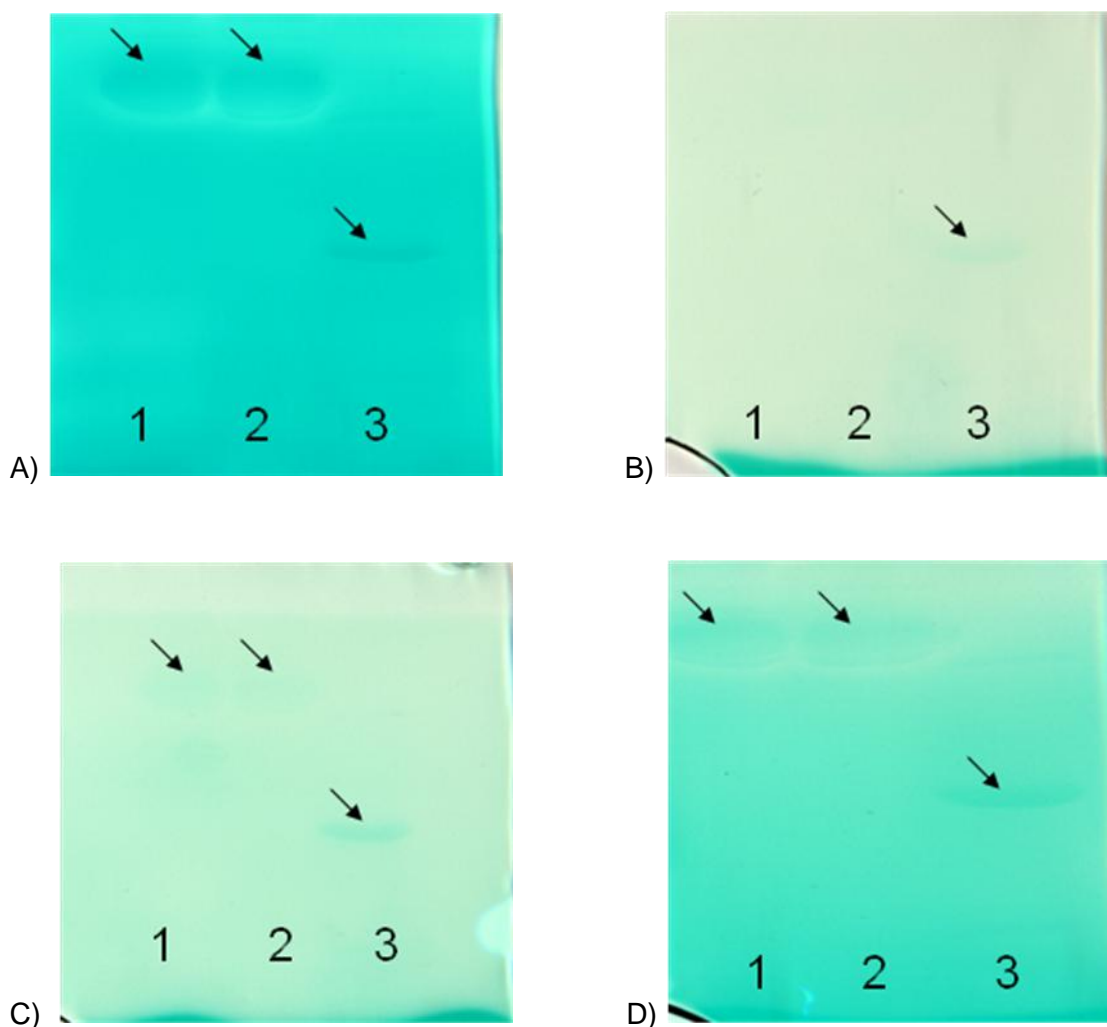
Jeden z gelů byl obarven původním způsobem a ponechán jako kontrola pro možnost srovnání (obr. 14 A). Jsou zde dobře vidět nespecificky obarvené proteiny.

U zbývajících gelů bylo před samotným barvením vyzkoušeno vymývání SDS pomocí ddH<sub>2</sub>O (obr. 14 B), Tritonem X-100 (obr. 14 C) a pomocí isopropanolu s kyselinou octovou (obr. 14 D).

Vymývání SDS pomocí ddH<sub>2</sub>O se zdá být úspěšné. Na gelu lze vidět jen velmi slabý proužek v poloze proteinu AHP5, u kterého předpokládáme přítomnost fosforylace.

Vymývání Tritonem X-100 je pravděpodobně také účinné. Z gelu je patrný výrazný proužek v poloze proteinu AHP5 a velmi slabé proužky s kontrolními proteiny (BSA, albumin). Intenzita jejich zbarvení je však v porovnání s kontrolním gelem výrazně nižší (obr. 14 A).

Poslední způsob, při kterém byl použit isopropanol v kombinaci s kyselinou octovou, se ukázal jako neúčinný. Na gelu jsou stále výrazně vidět nespecificky obarvené proteiny, stejně tak je stále intenzivně zabarveno i pozadí.



Obr. 14. Různé způsoby vymývání SDS z 15% SDS PAGE gelu: kontrola – barvení malachitovou zelení původním způsobem (A), vymytí pomocí ddH<sub>2</sub>O (B), vymytí Tritonem X-100 (C) a vymytí isopropanolem s kyselinou octovou (D).

Na gel byly nanесeny tyto proteiny v množství 20 µg/jamku: BSA (molekulová hmotnost 66,4 kDa, dráha 1), albumin (molekulová hmotnost 67 kDa, dráha 2), AHP5 (molekulová hmotnost 22,3 kDa, dráha 3). Po vymývání SDS byly všechny gely obarveny.

#### 4.3. Příprava vzorku pro CE-LIF analýzu

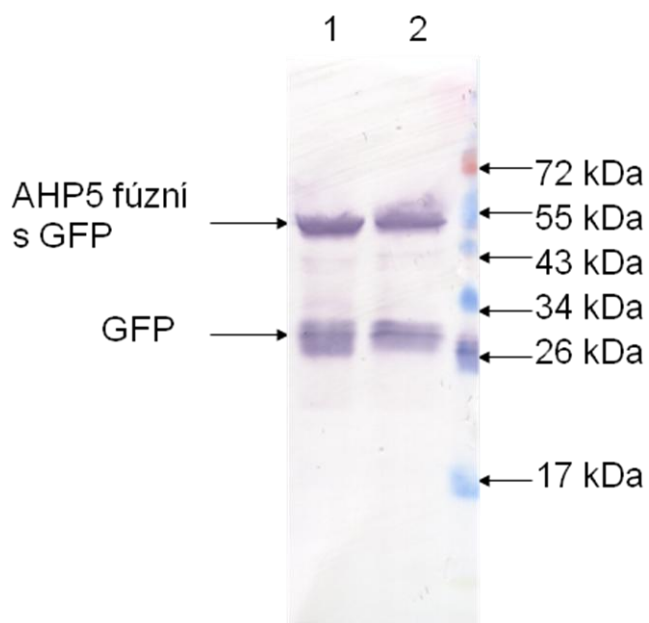
U připraveného proteinového lyzátu byla ověřena přítomnost AHP5 proteinu fúzaného s GFP pomocí westernového přenosu a detekce proteinu sérií dvou protilátek. Současně byl ověřován vliv teplot, za kterých je proteinový lyzát uchováván předtím, než je vzorek analyzován pomocí CE-LIF.

Proteinové lyzáty AHP5 proteinu fúzaného s GFP (jeden uchováván při teplotě -20 °C a druhý při teplotě -80 °C) byly nanесeny na 15% SDS PAGE. Po elektroforéze byly proteiny přeneseny na membránu. Pro orientaci na membráně byl použit hmotnostní standard (obr.15).

Na výsledném blotu je vidět nejen AHP5 fúzní protein s GFP (molekulová hmotnost asi 50 kDa), ale současně i samotný protein GFP (molekulová hmotnost 27 kDa) (obr.15). Tento

výsledek ukazuje na nestabilitu fúzního proteinu, která není ovlivněna teplotou skladování proteinů. Fúzní forma je však dostatečně produkována vzhledem k citlivosti metody.

Tento vzorek byl předán kolegům z Ústavu analytické chemie Masarykovy univerzity, kteří se zabývají vývojem metody CE-LIF.



*Obr. 15. Detekce proteinu AHP5 fúzovaného s GFP pomocí série dvou protilátek. Proteinové lyzáty byly nejdříve separovány pomocí 15% SDS PAGE a poté byly proteiny přeneseny na PVDF membránu metodou Western blot. Následně proběhla jejich detekce na membráně pomocí série dvou protilátek.*

*Pro porovnání vlivu teploty na uchování lyzátu byly použity dva vzorky: proteinový lyzát zamražený na -20°C (Dráha 1) a proteinový lyzát zamražený na -80°C (Dráha 2).*

## 5. ZÁVĚR

Teoretická část této práce se snaží uvést přehled metod, které by bylo možné využít pro studium histidinové fosforylace.

Jak již bylo uvedeno, najít vhodnou metodiku je kvůli nestabilitě fosfohistidinu dost problematické, ale na druhou stranu nezbytné vzhledem k jeho významné úloze v signálních drahách. Právě nestabilita se zdá být jednou z vlastností, která by se dala pro studium fosforylace histidinu využít např. u kolorimetrických metod detekujících velmi citlivě fosfát uvolněný z proteinu v kyselém prostředí. Metoda, pro kterou by neměla být stabilita modifikace během analýzy kritická, je ICP-MS, která analyzuje atomární složení vzorku a dává tak informaci o přítomnosti fosforu ve vzorku proteinu, ať už je ve volné nebo vázané formě. Velmi slibnou se v současné době zdá být metoda CE-LIF umožňující rozlišení jak fosforylovaných, tak nefosforylovaných forem proteinu přímo z nativního (bakteriálního či rostlinného) materiálu. Důležitou podmínkou je zajistit dostatečně stabilní prostředí pro fosfohistidin během lyze buněk.

Do této doby byly pro studium fosforylace proteinů cytokinininové signální dráhy použity pouze detekce pomocí značeného fosfátu. Nově navržené metody se zdají být pro studium fosforylace těchto proteinů vhodné. Proto bylo cílem praktické části práce vyzkoušet a popřípadě optimalizovat některé z nových metod pro analýzu fosforylace proteinů AHP.

Z výše uvedených byla vybrána kolorimetrická metoda barvení pomocí malachitové zeleně. Touto metodou se pravděpodobně podařilo předpokládaný fosforylovaný protein prokázat. Výsledek je však teprve předběžný a měl by být potvrzen nejlépe jinou citlivou metodou, např. ICP-MS. Jako druhá metoda byla zvolena CE-LIF. U této metody byl připraven bakteriální proteinový lyzát obsahující dostatečné množství proteinu AHP5 fúzovaného s GFP. Vzorek byl předán k analýze a v současnosti probíhá optimalizace této metody. Předpokládá se, že bude v budoucnu možná analýza fosforylovaných a nefosforylovaných forem proteinu pomocí CE-LIF přímo z rostlinného materiálu.

Současné výsledky ukazují, že studium molekulární podstaty signálních drah u rostlin může být důležité jak ve výzkumu základním, tak v jeho aplikaci v rostlinných biotechnologiích.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Attwood, P.V., et al., *Focus on phosphohistidine*. Amino Acids, 2007. **32**(1): p. 145-56.
2. Horák, J. and M. Lexa, *Dvoukomponentní systémy: regulátory odpovědi a přenos signálu u Arabidopsis thaliana*. Biologické listy, 2002. **67**: p. 297-317.
3. Halada, P., *Metodické přístupy současné fosfoproteomové analýzy*. Chemické listy, 2005. **99**: p. 922-929.
4. Wolschin, F. and W. Weckwerth, *Combining metal oxide affinity chromatography (MOAC) and selective mass spectrometry for robust identification of in vivo protein phosphorylation sites*. Plant Methods, 2005. **1**(1): p. 9.
5. Klumpp, S. and J. Krieglstein, *Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins*. Eur J Biochem, 2002. **269**(4): p. 1067-71.
6. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Two-dimensional phosphoamino acid analysis*. Methods Mol Biol, 2001. **124**: p. 49-65.
7. Weiler, E.W., *Sensory principles of higher plants*. Angew Chem Int Ed Engl, 2003. **42**(4): p. 392-411.
8. Stock, A.M., V.L. Robinson, and P.N. Goudreau, *Two-component signal transduction*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 183-215.
9. Chang, C., et al., *Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators*. Science, 1993. **262**(5133): p. 539-44.
10. Grefen, C. and K. Harter, *Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk*. Planta, 2004. **219**(5): p. 733-42.
11. Petr Tarkowski, K.D. and a.M. Strnad, *Analytické metody studia cytokininů*. Chem. Listy, 2004. **98**: p. 834 - 841.
12. Punwani, J.A., et al., *The Subcellular Distribution of the Arabidopsis Histidine Phosphotransfer Proteins is Independent of Cytokinin Signaling*. Plant J.
13. To, J.P. and J.J. Kieber, *Cytokinin signaling: two-components and more*. Trends Plant Sci, 2008. **13**(2): p. 85-92.
14. Yamada, H., et al., *The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane*. Plant Cell Physiol, 2001. **42**(9): p. 1017-23.
15. Ferreira, F.J. and J.J. Kieber, *Cytokinin signaling*. Curr Opin Plant Biol, 2005. **8**(5): p. 518-25.
16. Muller, B. and J. Sheen, *Arabidopsis cytokinin signaling pathway*. Sci STKE, 2007. **2007**(407): p. cm5.

17. Suzuki, T., et al., *The Arabidopsis sensor His-kinase, AHk4, can respond to cytokinins*. Plant Cell Physiol, 2001. **42**(2): p. 107-13.
18. Suzuki, T., et al., *An Arabidopsis histidine-containing phosphotransfer (HPT) factor implicated in phosphorelay signal transduction: overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitiveness to cytokinin*. Plant Cell Physiol, 2002. **43**(1): p. 123-9.
19. Mira-Rodado, V., et al., *Functional cross-talk between two-component and phytochrome B signal transduction in Arabidopsis*. J Exp Bot, 2007. **58**(10): p. 2595-607.
20. Medzihradszky, K.F., et al., *Synthesis and characterization of histidine-phosphorylated peptides*. Protein Sci, 1997. **6**(7): p. 1405-11.
21. Besant, P.G. and P.V. Attwood, *Detection and analysis of protein histidine phosphorylation*. Mol Cell Biochem, 2009. **329**(1-2): p. 93-106.
22. Robinson, V.L. and A.M. Stock, *High energy exchange: proteins that make or break phosphoramidate bonds*. Structure, 1999. **7**(3): p. R47-53.
23. Casino, P., V. Rubio, and A. Marina, *Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction*. Cell, 2009. **139**(2): p. 325-36.
24. Skerker, J.M., et al., *Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1043-54.
25. Skerker, J.M., et al., *Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis*. PLoS Biol, 2005. **3**(10): p. e334.
26. McCleary, W.R. and J.B. Stock, *Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators*. J Biol Chem, 1994. **269**(50): p. 31567-72.
27. Queiroz-Claret, C. and J.C. Meunier, *Staining technique for phosphatases in polyacrylamide gels*. Anal Biochem, 1993. **209**(2): p. 228-31.
28. Simonovic, A.D., S. Gaddameedhi, and M.D. Anderson, *In-gel precipitation of enzymatically released phosphate*. Anal Biochem, 2004. **334**(2): p. 312-7.
29. Gawronski, J.D. and D.R. Benson, *Microtiter assay for glutamine synthetase biosynthetic activity using inorganic phosphate detection*. Anal Biochem, 2004. **327**(1): p. 114-8.
30. D'Angelo, E., J. Crutchfield, and M. Vandiviere, *Rapid, sensitive, microscale determination of phosphate in water and soil*. J Environ Qual, 2001. **30**(6): p. 2206-9.
31. Bettmer, J., et al., *The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis*. J Proteomics, 2009. **72**(6): p. 989-1005.
32. Ryvolová, M., P.T., Patrik Vrábel, Josef Havel a Jan Preisler, *Derivatizace aminokyselin, peptidů a proteinů pro laserem indukovanou fluorescenční detekci v kapilární elektroforéze*. Chem. Listy, 2006. **100**: p. 191-195.

33. Yoon, S., et al., *Determination of protein phosphorylation and the translocation of green fluorescence protein-extracellular signal-regulated kinase 2 by capillary electrophoresis using laser induced fluorescence detection*. J Chromatogr A, 2004. **1056**(1-2): p. 237-42.
34. Garcia-Campana, A.M., M. Taverna, and H. Fabre, *LIF detection of peptides and proteins in CE*. Electrophoresis, 2007. **28**(1-2): p. 208-32.
35. Wikipedie, Posttranslační modifikace  
[http://cs.wikipedia.org/wiki/Posttranslační\\_modifikace](http://cs.wikipedia.org/wiki/Posttranslační_modifikace)
36. Wikipedia, Phosphatase  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Protein\\_phosphatase#Sub-types](http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_phosphatase#Sub-types)
37. University of Miami, Department of Biology  
<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/255/255enz/fig5x36.jpg>
38. Kiber, J., Cytokinin signaling  
<http://www.bio.unc.edu/faculty/kieber/lab/Cytokinin%20page.htm>
39. VŠCHT, Ústav biochemie a mikrobiologie  
<http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php>
40. VŠCHT, Ústav biochemie a mikrobiologie  
<http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/pmf.php>
41. Wikipedia, ICP-MS  
<http://cs.wikipedia.org/wiki/ICP-MS>
42. Carbonaro, R. F., Ph.D., Manhattan College  
<http://www.richardcarbonaro.com/projects/ce.png>



## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	<u>a</u> denosin <u>d</u> iphosphat
AHK	<u>a</u> rabidopsis <u>h</u> istidin <u>k</u> inase
AHP	<u>a</u> rabidopsis <u>h</u> istidin <u>p</u> hosphotransfer protein
APS	<u>a</u> mmonium <u>p</u> ersulphate
ARR	<u>a</u> rabidopsis <u>r</u> esponse <u>r</u> egulator
Asp	aspartát
ATP	<u>a</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BCIP	5- <u>b</u> romo-4- <u>c</u> hloro-3- <u>i</u> ndolyl <u>p</u> hosphat
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
CE-LIF	<u>c</u> apillary zone <u>e</u> lectrophoresis with <u>l</u> aser- <u>i</u> nduced <u>f</u> luorescence detection (kapilární zónová elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí)
CHASE	<u>c</u> yclases/ <u>h</u> istidine kinases <u>a</u> ssociated <u>s</u> ensory <u>e</u> xtracellular
CK	<u>c</u> ytok <u>i</u> nin
CRE1/WOL	<u>c</u> ytokinin <u>r</u> esponse/ <u>w</u> ooden <u>l</u> eg
CRF	<u>c</u> ytokinin <u>r</u> esponse <u>f</u> actors
DMF	<u>d</u> imethyl <u>f</u> ormamide
DTT	<u>d</u> ithio <u>t</u> hreitol
ESI	<u>e</u> lectro <u>s</u> pray <u>i</u> onization
ETR1	<u>e</u> thylen <u>r</u> eceptor
GFP	<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
His	histidin
HK	<u>h</u> istidin <u>k</u> inasa
HPt	<u>h</u> istidin <u>p</u> hospho <u>t</u> ransfer
ICP-MS	<u>i</u> nductively <u>c</u> oupled <u>p</u> lasma <u>m</u> ass <u>s</u> pectroscopy (hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem)
IPTG	<u>i</u> sopropyl $\beta$ -D-1- <u>t</u> hiogalactopyranoside
MALDI	<u>m</u> atrix- <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption/ <u>i</u> onization
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	<u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry
NBT	<u>n</u> itro <u>b</u> enzen <u>t</u> etrazolium
PAGE	<u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
PTM	<u>p</u> ost <u>t</u> ranslační <u>m</u> odifikace
RR	<u>r</u> esponse <u>r</u> egulator
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
Ser/Thr	serin/threonin
TB	<u>t</u> errific <u>b</u> roth
TBST	<u>t</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline and <u>T</u> ween 20
TCS	<u>t</u> wo- <u>c</u> omponent <u>s</u> ystem
TEMED	<u>t</u> etramethylend <u>i</u> amin
TOF	<u>t</u> ime <u>o</u> f <u>f</u> light
Tyr	tyrosin